

优化使用安捷伦的 FTIR 成像系统分析多不饱和脂肪酸的组织样品的准备和存储

应用简报

生物医学

作者

Catherine R. Liao*, David Stitt*,
Marzena Z. Kastyak PhD*, Jason
B. Morrison PhD**, Benedict C.
Albensi PhD***, Jonah Kirkwood
PhD†, Mustafa Kansiz PhD†† and
Kathleen M. Gough PhD*

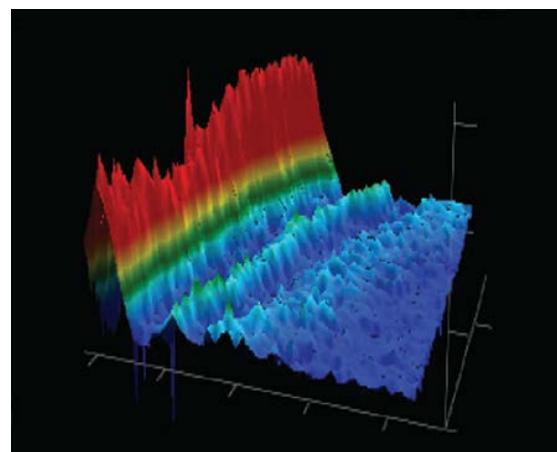
* 曼尼托巴大学化学系, Winnipeg,
MB, Canada

** 曼尼托巴大学生物系统系

*** 圣博尼医学研究中心, Manitoba

† 安捷伦科技公司, Mississauga,
ON, Canada

†† 安捷伦科技公司, Mulgrave, VIC,
Australia



前言

哺乳动物需要在饮食中摄取多不饱和脂肪酸 (PUFA), 例如二十二碳六烯酸 (DHA), 二十碳五烯酸 (EPA) 和花生四烯酸 (AA), 用以维持各式各样的生物过程, 包括维持视网膜和大脑的正常功能。例如, 在脑组织中, 由于体内的酶或自由基作用引发的 DHA 氧化被认为是导致阿尔茨海默病并发症的原因 [1, 2]。高空间分辨率的傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 成像系统是一个性能强大的工具, 可用来调查疾病动物模型的组织切片中的 PUFA 分布, 提供在亚细胞级别生化组成的详尽信息。



Agilent Technologies

长期以来，人们一直认为组织成分在特定的存储条件下（黑暗、干燥、室温）是稳定的。最近，我们发现有些 PUFA 的吸收谱带，即烯烃官能团（C=C-H，对 3012 cm^{-1} 谱带处的积分区域成像）会随着时间而减少，此外脂质中的羰基（C=O，在 1735 cm^{-1} 处）也会略有减少。本研究的目的是探讨导致这种氧化降解的因素，以及确定方案来使得损耗率降至最低，以确保采用光谱技术能准确评估生物组织中的 PUFA 值。

实验方法

组织获得

从 13 个月的野生型小鼠 (C57BL/6) 身上获得组织。方案管理审核委员会基于加拿大动物保护理事会确立的指导方案批准了所有的动物实验方案。

样品前处理

将采用最佳切削温度复合物 (OCT, Sakura Finetek Inc., 美国) 包埋的视网膜样品在液氮冷却环境下的装有异戊烷的烧杯里急冻。然后在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 $7\text{ }\mu\text{m}$ 厚度将其进行冷冻切片，并放置在 MirrIR 基板 (Kevley Technologies, Chesterland, OH) 或氟化钡窗片上。每个样品都存储在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下密封的塑料盒内以保存其中的生化组份。成像前，将单个切片放在室温下装有硅珠干燥剂的黑暗载片盒内，直至干燥。

通过监测放置于窗边实验桌上的氟化钡窗片上的样品在 3012 cm^{-1} 处的谱带，证实了明亮的室内光线和室温可能会导致 PUFA 的氧化。在一开始以及正常日夜交替光线影响下的 24 小时和 90 小时，分别对视网膜样品进行成像。

此后的几个月内监测典型的切片保存环境的影响，用来评估在标准条件下，即黑暗、室温的储存条件下大概的降解量。从冰箱里取出切片后 12 小时采集第一个红外光谱图像，再在干燥/解冻后的第 3、7、15、31 和 272 天分别采集图像。样品曝光时间必须控制在数据收集前对 FTIR 显微镜进行必要设置的短时间内。测量图像时需要关闭室内的灯和显微镜的照明光源。

仪器

图像获取采用连接到 Agilent Cary 670 FTIR 光谱仪上的 Agilent Cary 620 FTIR 光谱化学显微镜，配置 64×64 像素的焦平面阵列 (FPA) 检测器，像素分辨率为 5.5 微米。所有 MirrIR 数据收集是使用反射模式 (MirrIR) 或透射模式 (氟化钡) 的马赛克图像分析，然后使用内部软件程序和 Agilent Resolutions Pro 软件进行处理。获得的谱图在 $4000 - 900\text{ cm}^{-1}$ 的光谱范围内，光谱分辨率为 4 cm^{-1} 。所有视网膜样品的谱图是采用 256 次扫描叠加而成，并除以相同扫描次数叠加而成的背景。仪器操作参数见表 1。

表 1. Agilent Cary 670 FTIR 和 620 FTIR 显微镜的参数组合

参数	数值
速度	5 kHz
光谱分辨率	4 cm^{-1}
扫描次数	256
空间分辨率	5.5 μm
马赛克	7×4 方块 ($\sim 2.5 \times 1.4\text{ mm}$)

结果和讨论

在加速暴露的条件下, PUFA 的损失是非常明显的。第 1 天的 PUFA 分布的 3D 图像 (图 1 和图 2) 表明, 与预期一样, PUFA 在视网膜样品中的分布是不均匀的。PUFA 的最高浓度出现在 ROS 中, 其围绕视网膜的外部区域形成一个弧形。选出完全位于该弧形范围内的方块像素, 即使是在最初采集的图像中, 这些方块像素所含有的 PUFA 含量也有所差异, 不过的确代表了 PUFA 浓度最高的区域。用对照组小鼠的视网膜切片成像来评估在正常的储存条件下 PUFA 随着时间逐渐减少的含量。图 2 表明在黑暗、干燥的室温条件下, 烯基 CH 的强度在两周之后的损失非常明显。

在日光照明下, 视网膜细胞的复合组织在切片未染色的部分产生层状图案 (见图 1)。PUFA 含量在 ROS 盘中最高 (图 1B、C), 而沿着轴突方向检测到的量较少。在加速暴露条件下的 48 小时之内, 所有 PUFA 的痕迹全部消失 (数据未显示)。

一个月后, PUFA 损失较为明显; 八个月后, 只有少量的 PUFA 存在。这些观测结果表明, 在典型的实验室环境中, 解冻后第三天或第四天时, 样品仍含有可测量的 PUFA 含量, 甚至经过几周的存储后, 可在例如视网膜的视杆细胞外节 (ROS) 中检测到较高的 PUFA。

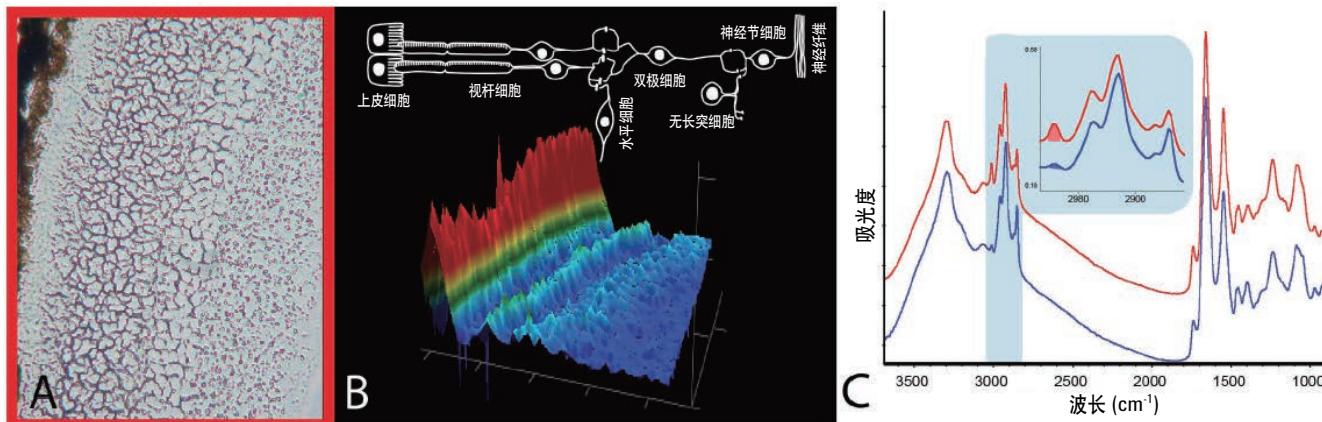


图 1. 刚解冻的视网膜组织切片的显微镜照片和 FTIR 成像结果 (A) 组织的显微镜照片, 从外色素层到神经节区。(B) 经处理的 FTIR 图像 (1×3 方块), 表示在 3012 cm^{-1} 处的烯基 CH 伸缩振动的积分区域; 在 12 个小时后获得的图像 (在黑暗条件下解冻和干燥后立即采集)。切片横截面的细胞分布示意图; 白色圆圈表示原子核。(C) 从视杆细胞的视盘中提取的谱图 (高 PUFA 含量, 红色), 以及从视杆和双极细胞之间的轴突区提取的谱图 (低 PUFA 含量, 蓝色), 突出显示了 3012 cm^{-1} 处的谱带进行积分

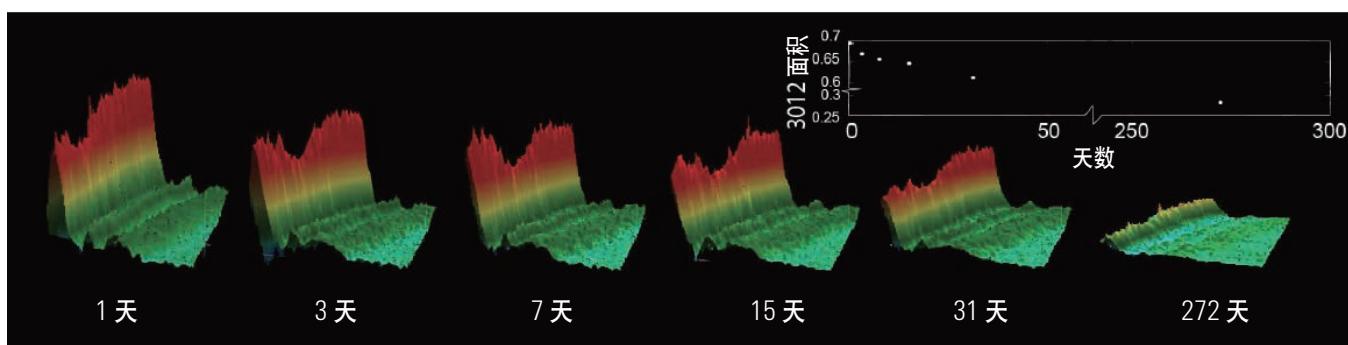


图 2. FTIR 成像结果表明, 视网膜组织切片长期存储在黑暗、干燥的室温条件下时, PUFA 值稳定减少。FTIR 图像 (1×3 块) 针对 3012 cm^{-1} 处的烯基 CH 伸缩振动谱带积分区域进行了处理。第一个图像是在 12 小时后获得的 (在黑暗条件下解冻和干燥后立即采集), 其余的图像是在相同的存储条件下 8 个月内按上述时间间隔取出采集。插图表明, PUFA 谱带强度 (代表最高强度区域的 36 个像素的平均值) 在第 1 天开始降低

数据来自加拿大温尼伯的曼尼托巴大学的 Kathleen Gough 博士。

图 2 所示的 FTIR 图像提供了 PUFA 在视网膜组织内分布的定性信息，同时通过每个图像的一组 36 个像素的积分峰面积测量，可得出氧化后 C=C-H 损失的定量数据。

从每个时间点测得的烯基 CH 谱带区域积分的平均值图中(图 2 右上角)可以看出，仅仅几天之内，PUFA 的损失迅速、稳定，非常明显。第一次测量后，平均值明显地下降，并在前两个星期内减少了大约 8%。此后继续逐步下降，一个月后已经消失了大约 15%。而八个月后，只能检测到不到三分之一的 PUFA。

在 1735 cm^{-1} 处的羰基谱带强度也有少量的减少，通常认为羰基来源于脂质。这个谱带没有完全消失，连同观察到的 OH 伸缩振动区域的曲线也随着时间的推移而变化，这一现象被解释为存在新的、未知的氧化产物。

结论

Agilent 670 和 620 FTIR 成像显微镜系统已被成功地用于分析刚解冻的小鼠视网膜组织切片的 PUFA 水平，以及追踪光谱生物标记物在标准储存条件下随着时间推移而出现的损失。结果表明，为了获得相对准确的烯烃官能团 (C=C-H) 的数据，新鲜的冰冻切片样本应该在黑暗的条件下解冻和干燥后尽快成像。否则，可能会导致组织样品中的 PUFA 含量被低估。

这些发现将会给其他研究小组使用 FTIR 分析生物组织样品中的 PUFA 值提供参考。

参考文献

1. Fraser, T., Taylor, H. & Love, S. (2010). *Neurochem. Res.*, *35*, 503–513.
2. Hartmann, T., Kuchenbecker, J. & Grimm, M. O. W. (2007). *J. Neurochem.*, *103*, 159–170.

更多信息

Stitt, D. M., Kastyak-Ibrahim, M. Z., Liao, C. R., Morrison, J., Albensi, B. C. & Gough, K. M. (2012). *Tissue acquisition and storage associated oxidation considerations for FTIR microspectroscopic imaging of polyunsaturated fatty acids. Vib. Spectrosc.*, *60*, 16-22

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

安捷伦科技公司对本资料可能存在的错误，或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中涉及的信息、说明和规格，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2014

2014 年 10 月 1 日, 中国印刷
出版号: 5991-0293CHCN



Agilent Technologies